

WO 090002601 A1
MAR 1990

NDIALE DE LA PROPRIETE INTELLECTUELLE
Bureau international



TSM

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIEE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

| | | |
|--|----|--|
| (51) Classification internationale des brevets ⁵ : B01D 57/02, C07K 3/14 G01N 27/26 | A1 | (11) Numéro de publication internationale: WO 90/02601 (43) Date de publication internationale: 22 mars 1990 (22.03.90) |
|--|----|--|

(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR89/00441

(22) Date de dépôt international: 4 septembre 1989 (04.09.89)

(30) Données relatives à la priorité:

88/11626 6 septembre 1988 (06.09.88) FR
88/15246 23 novembre 1988 (23.11.88) FR

(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): BERTIN & CIE [FR/FR]; B.P. No. 3, F-78373 Plaisir Cédex (FR).

(72) Inventeur; et

(75) Inventeur/Déposant (US seulement): DUTERTRE, Bernard [FR/FR]; 14, rue du Château, F-92200 Neuilly-sur-Seine (FR).

(74) Mandataire: CABINET ORES; 6, avenue de Messine, F-75008 Paris (FR).

(81) Etats désignés: AU, BR, DK, JP, KR, NO, US.

Publiée

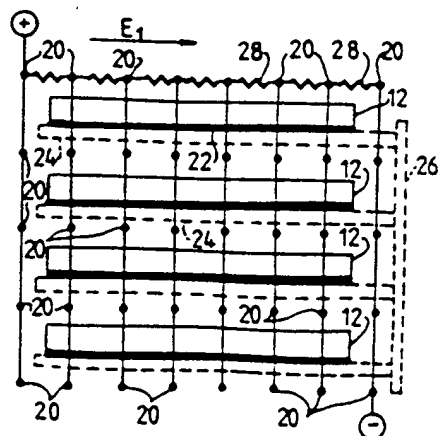
Avec rapport de recherche internationale.

(54) Title: PROCESS AND DEVICE FOR CONTROLLED MIGRATION OF MACROMOLECULES IN RECTANGULAR GEL PLATES BY MULTIPLE ELECTROPHORESIS

(54) Titre: PROCÉDE ET DISPOSITIF D'ELECTROPHORESE MULTIPLE POUR ASSURER LA MIGRATION CONTROLÉE DE MACROMOLECULES DANS DES PLAQUES RECTANGULAIRES DE GEL

(57) Abstract

Process and device for controlled migration, by multiple electrophoresis, of macromolecules in gel plates stacked perpendicular to their plane, using a series of electrodes (20) arranged at the intersections of two series of perpendicular planes, some perpendicular to the plates and to the desired direction of migration of the macromolecules, the others perpendicular to the former and parallel to the plates (12). The electrodes are interconnected in a selective and controlled manner so as to ensure, on the one hand, the separation of the macromolecules in the plates (12) and, on the other hand, their transfer to the membranes (22) associated with the plates (12). The invention is applicable in particular to the separation and transfer by electrophoresis of macromolecules such as proteins and nucleic acids.



(57) Abrégé

Procédé et dispositif d'électrophorèse multiple pour la migration contrôlée de macromolécules dans des plaques de gel empilées dans une direction perpendiculaire à leur plan, au moyen d'une série d'électrodes (20) disposées selon les intersections de deux séries de plans perpendiculaires, les uns perpendiculaires aux plaques (12) et à la direction souhaitée de migration des macromolécules, les autres perpendiculaires aux premiers et parallèles aux plaques (12), les électrodes étant reliées entre elles de façon sélective et commandée pour assurer, d'une part, la séparation des macromolécules dans les plaques (12), puis, d'autre part, leur transfert sur des membranes (22) associées aux plaques (12). L'invention s'applique notamment à la séparation et au transfert par électrophorèse de macromolécules telles que des protéines ou des acides nucléiques.

2 1/616

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

| | | | | | |
|----|-----------------------------------|----|--|----|-----------------------|
| AT | Autriche | ES | Espagne | MG | Madagascar |
| AU | Australie | FI | Finlande | ML | Mali |
| BB | Barbade | FR | France | MR | Mauritanie |
| BE | Belgique | GA | Gabon | MW | Malawi |
| BF | Burkina Faso | GB | Royaume-Uni | NL | Pays-Bas |
| BG | Bulgarie | HU | Hongrie | NO | Norvège |
| BJ | Bénin | IT | Italie | RO | Roumanie |
| BR | Brésil | JP | Japon | SD | Soudan |
| CA | Canada | KP | République populaire démocratique de Corée | SE | Suède |
| CF | République Centrafricaine | KR | République de Corée | SN | Sénégal |
| CG | Congo | LJ | Liechtenstein | SU | Union soviétique |
| CH | Suisse | LK | Sri Lanka | TD | Tchad |
| CM | Cameroon | LU | Luxembourg | TG | Togo |
| DE | Allemagne, République fédérale d' | MC | Monaco | US | Etats-Unis d'Amérique |
| DK | Danemark | | | | |

PROCEDE ET DISPOSITIF D'ELECTROPHORESE MULTIPLE POUR ASSU-
RER LA MIGRATION CONTROLEE DE MACROMOLECULES DANS DES
5 PLAQUES RECTANGULAIRES DE GEL

L'invention concerne un procédé et un disposi-
tif d'électrophorèse multiple, permettant d'assurer la mi-
gration contrôlée de macromolécules dans des plaques rec-
10 tangulaires de gel.

On utilise actuellement des techniques de sépa-
ration de macromolécules, telles que des protéines ou des
acides nucléiques, par électrophorèse au moyen d'un champ
électrique appliqué aux extrémités longitudinales d'une
15 plaque rectangulaire d'un gel approprié, par exemple
d'agarose ou de polyacrylamide. Des échantillons de macro-
molécules, par exemple d'acides nucléiques, à séparer sont
déposés dans des puits formés dans le gel, le long d'un
bord de la plaque, puis l'ensemble est immergé dans un li-
20 quide approprié d'électrophorèse. Les électrodes placées
contre le bord précité de la plaque et le bord opposé de
celle-ci sont reliées à des potentiels différents, de sorte
qu'un champ électrique s'établit entre les électrodes dans
un sens correspondant à la direction souhaitée de migration
25 des macromolécules dans la plaque de gel. Sous l'effet du
champ électrique, les macromolécules des échantillons logés
dans les puits se déplacent vers le bord opposé de la
plaque, à travers le gel, à des vitesses qui sont fonction
notamment de leur masse moléculaire, de sorte qu'au bout
30 d'un temps donné, des macromolécules de masses moléculaires
différentes ont parcouru dans le gel des distances diffé-
rentes.

Dans une technique connue, les macromolécules
ainsi séparées sont ensuite transférées, soit par aspira-
15 tion, soit au moyen d'un champ électrique orienté
perpendiculairement à la plaque dans le sens voulu, sur une

membrane placée sur une grande face de la plaque de gel, en vue de leur hybridation et de leur détection ultérieures.

5 Cette technique et les appareils qui ont été réalisés pour sa mise en oeuvre, relèvent essentiellement du laboratoire, c'est-à-dire qu'il s'agit d'appareils de petite taille, fonctionnant à faible cadence, traitant les plaques de gel l'une après l'autre, etc...

10 En outre, les séparations réalisées avec ces appareils ne sont pas parfaitement répétitives et peuvent varier d'une plaque à l'autre ou d'un échantillon à l'autre dans la même plaque, ne serait-ce que parce que le champ électrique développé entre les deux électrodes n'est pas uniforme, en raison de l'hétérogénéité du milieu traversé, de sorte que des macromolécules identiques, de même masse
15 moléculaire, peuvent migrer sur des distances différentes si elles sont placées en des points différents d'une même plaque, ou sur des plaques différentes.

Il en résulte notamment des difficultés d'interprétation des résultats, et une impossibilité
20 d'automatiser les appareils de séparation de macromolécules par électrophorèse.

L'invention a notamment pour but d'éviter ces inconvénients de la technique antérieure.

25 Elle a pour objet un procédé et un dispositif d'électrophorèse multiple, permettant de réaliser une séparation de macromolécules dans des plaques de gel, de façon fiable, fidèle, répétitive et parfaitement automatisable.

30 L'invention a encore pour objet un procédé et un dispositif de ce type qui permettent de traiter simultanément un grand nombre de plaques de gel.

L'invention a encore pour objet un procédé et un dispositif du type précité, permettant de modifier à volonté les conditions de séparation des macromolécules, notamment par variation contrôlée du champ électrique appliqué aux plaques de gel pour la migration des macromolécules.
35

3

L'invention propose, à cet effet, un procédé d'électrophorèse multiple pour assurer la migration contrôlée de macromolécules dans des plaques rectangulaires de gel, caractérisé en ce qu'il consiste :

5 - à empiler plusieurs plaques perpendiculairement à leur plan en les maintenant espacées pour en former au moins une pile parallélépipédique,

 - à disposer entre les plaques et/ou au voisinage des faces de cette pile une pluralité d'électrodes allongées, par exemple filiformes, parallèles entre elles et
10 aux plans des plaques, et contenues dans une série de plans perpendiculaires à une direction commune souhaitée de migration des macromolécules dans les plaques,

 - à immerger l'ensemble des plaques et des
15 électrodes dans un bain de liquide approprié d'électrophorèse,

 - à porter à un même potentiel les électrodes contenues dans un même plan perpendiculaire à la direction
20 de migration,

 - et à contrôler dans l'espace et/ou dans le temps, les différences de potentiel entre les différents plans, pour créer dans le bain et à travers les plaques un champ électrique dont la direction est en tous points sensiblement parallèle à la direction souhaitée de migration.

25 Les électrodes contenues dans des plans perpendiculaires à la direction souhaitée de migration des macromolécules définissent des surfaces équipotentiellles qui sont sensiblement planes, au moins en première approximation, puisqu'elles sont définies par des droites parallèles
30 et coplanaires.

 Le champ électrique étant nécessairement normal aux surfaces équipotentiellles, qui sont elles-mêmes perpendiculaires à la direction souhaitée de migration, on obtient ainsi nécessairement, dans les plaques de gel, un
35 champ électrique orienté dans la direction voulue, au moins au niveau de chaque électrode, et cela malgré

l'hétérogénéité du milieu soumis au champ électrique.

Il en résulte un contrôle de l'amplitude et de l'orientation du champ électrique à travers les plaques de gel, qui est tel que l'on obtient, dans des conditions
5 identiques, des séparations de macromolécules et des mesures parfaitement répétitives.

Il en découle la possibilité d'automatiser les processus de séparation de macromolécules, et de les commander par ordinateur, par exemple au moyen d'un automate
10 décrit dans une autre demande de brevet de la demanderesse, déposée ce même jour.

Selon une autre caractéristique de l'invention, les électrodes sont disposées aux intersections des plans cités avec une autre série de plans perpendiculaires à une
15 seconde direction souhaitée de migration, cette seconde direction étant perpendiculaire à la première, et le procédé consiste à contrôler successivement les potentiels des électrodes des plans de la première série, puis ceux des électrodes des plans de l'autre série, pour faire migrer
20 les macromolécules dans lesdites plaques successivement dans la première direction citée, puis dans la seconde.

On peut, de cette façon, réaliser non seulement la séparation des macromolécules dans les plaques de gel, mais également leur transfert sur des membranes appropriées
25 placées le long d'une des grandes faces des plaques de gel.

Le procédé selon l'invention prévoit de créer, par une distribution uniforme de potentiel sur les plans d'électrodes régulièrement répartis par rapport à la pile de plaques, un champ électrique uniforme à travers les
30 plaques de la pile.

Le procédé selon l'invention prévoit également de faire varier l'amplitude et/ou le sens du champ électrique à travers les plaques de la pile, par variation de la distribution des potentiels sur les plans d'électrodes.

35 Les variations dans le temps des différences de potentiel entre les plans d'électrodes peuvent être syn-

5

chrones et égales entre elles, pour faire varier dans le temps l'amplitude du champ électrique sans modifier sa distribution dans l'espace, ou bien les différences de potentiel entre plans d'électrodes peuvent être modifiées localement, pour faire varier localement l'intensité du champ électrique.

Le procédé selon l'invention prévoit encore de modifier, cycliquement ou non, les différences de potentiel entre les plans d'électrodes.

On peut, de cette façon, faire migrer les macromolécules par à-coups dans une direction souhaitée de migration.

Selon encore une autre caractéristique de l'invention, le procédé consiste également à disposer côte à côte au moins deux piles de plaques, en les juxtaposant dans une direction parallèle ou perpendiculaire à la direction précitée de migration.

On peut ainsi traiter par des champs électriques différents les plaques de gel des différentes piles.

L'invention propose encore un dispositif d'électrophorèse multiple pour assurer la migration contrôlée de macromolécules dans des plaques de gel, comprenant une cuve destinée à recevoir les plaques de gel, des électrodes agencées pour créer un champ électrique dans les plaques de gel, et des moyens d'amenée dans la cuve et d'extraction de la cuve d'un liquide approprié d'électrophorèse, caractérisé en ce que ce dispositif comprend :

- des moyens de support destinés à recevoir au moins un empilement de plaques de gel en les maintenant espacées les unes des autres,

- une série d'électrodes parallèles entre elles et aux plaques de la pile, disposées dans des plans perpendiculaires à une direction souhaitée de migration des macromolécules à travers les plaques,

6

- des moyens de liaison électrique entre électrodes d'un même plan, permettant en particulier de les maintenir à un même potentiel,

5 - des moyens de liaison entre électrodes de plans différents, permettant en particulier de maintenir une différence de potentiel entre deux plans consécutifs,

- des moyens d'application de potentiel au moins aux électrodes situées dans des plans d'extrémités entre lesquels est disposée la pile de plaques,

10 - et des moyens de commande pour faire varier dans l'espace et/ou dans le temps la distribution des potentiels des électrodes desdits plans.

De préférence, les électrodes seront réparties régulièrement entre les extrémités des plaques de gel,
15 ainsi qu'entre ces plaques.

Les électrodes sont disposées aux intersections de deux séries de plans, les premiers étant perpendiculaires aux plaques et à la direction souhaitée de migration, les seconds étant perpendiculaires aux premiers et
20 parallèles aux plaques.

Selon une autre caractéristique de l'invention, les moyens de liaison entre deux électrodes consécutives d'un même plan sont du type à conduction électrique commandée, variable entre un état de conduction à résistance sensiblement nulle et au moins un état de conduction à résistance de valeur prédéterminée, non nulle.
25

Ces moyens de liaison peuvent notamment être des composants électroniques, tels que des transistors, des thyristors, etc..., qui sont sélectivement conducteurs ou
30 bloqués.

Ces moyens de liaison peuvent être commandés individuellement ou par groupes, et de préférence par des moyens qui sont communs à toutes les électrodes situées dans un même groupe de plans parallèles.

35 Dans un mode de réalisation de l'invention, les moyens de liaison entre électrodes et les moyens de com-

7

mande sont portés par au moins une plaque de matière diélectrique, sur laquelle sont fixées les électrodes par une de leurs extrémités.

Selon une autre caractéristique de l'invention, le support est destiné à recevoir au moins deux piles de plaques disposées côte à côte et juxtaposées dans au moins une direction parallèle à leurs plans, et en ce qu'une série d'électrodes du type précité, comprenant les moyens précités de commande et de liaison entre électrodes, est associée à chaque pile de plaques, pour créer dans les plaques des différentes piles des champs électriques qui sont à volonté identiques ou différents, liés ou indépendants les uns des autres.

Selon un mode de réalisation préféré de l'invention, les électrodes précitées sont intégrées à un panier mobile formant le support des plaques de gel.

En pratique, il suffit de réunir entre elles ces électrodes par des plaques, perforées ou non, ou des grilles de matériau diélectrique pour disposer d'un panier support, entre les électrodes duquel on peut disposer les plaques de gel, et que l'on va immerger dans la cuve et extraire de la cuve par la face horizontale supérieure de celle-ci.

L'invention prévoit également que les extrémités, par exemple inférieures, des électrodes précitées comportent des moyens de liaison ou de raccordement à des électrodes portées par la paroi correspondante, par exemple de fond, de ladite cuve.

Il suffit donc, dans ce cas, de déposer le panier sur le fond de la cuve pour que les électrodes verticales du panier puissent être reliées aux moyens d'application de potentiel et aux circuits de commande du dispositif, par l'intermédiaire des électrodes du fond de la cuve.

Avantageusement, ces moyens de liaison ou de raccordement forment également des moyens de positionnement

8

du panier dans la cuve.

De préférence, les électrodes du fond de la cuve sont sensiblement ponctuelles, et forment un réseau à maille carrée ou rectangulaire, à côtés respectivement parallèles et perpendiculaires à la direction souhaitée de migration des macromolécules.

Elles sont reliées entre elles par des moyens de liaison commandés, permettant sélectivement de maintenir à un même potentiel les électrodes situées dans un même plan perpendiculaire à la direction souhaitée de migration des macromolécules, et d'établir une différence de potentiel entre deux successifs de ces plans.

L'invention prévoit également, dans ce cas, que les parois verticales de la cuve comportent des électrodes linéaires verticales, raccordées également à des moyens commandés de liaison permettant sélectivement d'établir entre elles des différences de potentiel, ou bien de les mettre à un même potentiel.

Afin d'augmenter la capacité de traitement du dispositif selon l'invention, le panier peut contenir, à un même niveau, au moins deux séries de plaques de gel, disposées tête-bêche, c'est-à-dire dans lesquelles les plaques d'une série sont sensiblement dans le prolongement des plaques de l'autre série, mais orientées longitudinalement dans un sens opposé, par rapport à la position initiale des macromolécules.

On peut ainsi traiter plusieurs doubles séries de plaques de gel, sans augmenter pour autant la différence de potentiel totale dans la cuve au-delà de celle requise pour une plaque.

L'invention prévoit également que les électrodes verticales du panier sont entourées par des manchons ou tubes cylindriques de matière diélectrique, perforés ou poreux vis à vis du liquide d'électrophorèse.

Ces tubes, ouverts à leurs extrémités, forment des pièges pour les bulles de gaz produites par électro-

9

lyse au contact des électrodes, et guident les bulles vers la surface libre du liquide, sans qu'elles puissent venir au contact des plaques de gel.

Dans la description qui suit, faite à titre d'exemple, on se réfère aux dessins annexés, dans lesquels:

- la figure 1 représente schématiquement un appareil connu de séparation de macromolécules par électrophorèse ;
- la figure 2 est une vue schématique de bout d'une série d'électrodes propres à être utilisées dans un dispositif selon l'invention ;
- la figure 3 représente la même série d'électrodes, mais commandée de façon différente ;
- la figure 4 représente schématiquement une série semblable d'électrodes et ses moyens de commande ;
- la figure 5 représente schématiquement, en vue de dessus, la disposition de quatre séries d'électrodes selon l'invention, pour quatre piles de plaques de gel ;
- les figures 6 et 7 sont deux vues schématiques en perspective d'un réseau d'électrodes selon deux réalisations différentes de l'invention ;
- la figure 8 est une vue schématique en élévation d'un panier de support de plaques de gel ;
- la figure 9 est une vue de côté de ce panier ;
- la figure 10 est une vue schématique en perspective d'un panier de support de plaques ;
- la figure 11 est une vue schématique en perspective, avec arrachement partiel, d'une cuve d'électrophorèse ;
- la figure 12 est une vue partielle, à plus grande échelle, d'un moyen de positionnement de panier dans la cuve ;
- la figure 13 est une vue schématique du circuit de liaison des électrodes du fond de la cuve ;
- la figure 14 est une vue schématique en perspective, avec arrachement partiel d'une autre forme de

réalisation d'une cuve d'électrophorèse ;

-la figure 15 est une vue schématique partielle, en coupe transversale, de tubes poreux montés autour des électrodes verticales d'un panier.

5 En figure 1, on a représenté très schématiquement le principe de la séparation des macromolécules dans une plaque de gel par électrophorèse.

Des échantillons contenant des macromolécules, par exemple des acides nucléiques, sont déposés dans des puits 10 formés dans une plaque rectangulaire 12 d'un gel d'agarose ou de polyacrylamide, le long d'un des petits côtés de cette plaque. La plaque de gel 12 contenant les échantillons est disposée dans une cuve 14 d'électrophorèse entre deux électrodes 16 (respectivement une anode et une cathode), dans la position représentée en figure 1. La cuve 15 14 est ensuite remplie d'un liquide approprié d'électrophorèse, puis les électrodes 16 sont reliées aux bornes d'une source d'énergie électrique, de façon à ce qu'il s'établisse entre les électrodes une différence prédéterminée de potentiel créant un champ électrique allant 20 d'une électrode à l'autre dans la direction voulue de migration des macromolécules contenues dans les puits 10, à travers la plaque de gel 12.

Les vitesses de migration des macromolécules à travers la plaque 12, en direction du bord opposé de cette plaque, sont fonction de leur masse moléculaire. En conséquence, au bout d'un temps donné, les macromolécules auront parcouru dans la plaque 12 des distances qui sont fonction de leur masse moléculaire. On a représenté, à titre 30 d'exemple, des distances D1, D2, D3 parcourues par des macromolécules depuis un puits 10.

Cette séparation des macromolécules en fonction de leur masse moléculaire permet, après transfert sur une membrane et marquage par hybridation ou autre procédé, 35 d'identifier et de reconnaître les macromolécules marquées au moyen de sondes appropriées.

Les applications d'une telle technique sont multiples et intéressent de plus en plus l'industrie. Cependant, les appareils connus d'électrophorèse ne peuvent être utilisés qu'en laboratoire et ne sont pas susceptibles d'automatisation.

Il en est ainsi notamment parce que le milieu dans lequel s'établit le champ électrique, entre les électrodes 16, est particulièrement hétérogène : il comprend la plaque 12, la membrane de transfert qui se trouve le long d'une grande face de la plaque 12, le liquide d'électrophorèse qui baigne la plaque 12 et les électrodes 16, le support de la plaque 12 et de la membrane, etc... Le champ électrique entre les électrodes 16 n'est donc pas uniforme et n'est pas non plus orienté en tous points parallèlement à la direction souhaitée de migration des macromolécules dans la plaque 12. Par réaction électrochimique, il se produit également des bulles dans le liquide d'électrophorèse au contact des électrodes, en raison de la différence de potentiel relativement importante entre les électrodes 16 et de leur faible surface, et ces bulles qui se détachent des électrodes sont susceptibles de gêner ou d'influencer les migrations des macromolécules.

Comme indiqué, le procédé et le dispositif selon l'invention permettent d'éviter ces inconvénients de la technique actuelle et en outre d'automatiser la séparation et le transfert des macromolécules par électrophorèse.

Le procédé et le dispositif selon l'invention permettent également de traiter simultanément un grand nombre de plaques de gel, comprenant des échantillons de macromolécules à séparer.

On fera donc maintenant référence aux figures 2 et 3, qui illustrent schématiquement certaines caractéristiques essentielles de l'invention, applicables notamment à la migration des macromolécules à travers les plaques de gel, et au transfert des macromolécules sur les membranes associées aux plaques de gel.

12

Le dispositif selon l'invention comprend essentiellement, dans une cuve d'électrophorèse de dimensions appropriées, une série d'électrodes 20 de forme allongée, constituées par exemple par des fils de matériau électro-

5 conducteur approprié. Les électrodes 20 sont parallèles entre elles et s'étendent perpendiculairement au plan du dessin dans les figures 2 et 3. Elles sont disposées aux intersections de deux séries de plans perpendiculaires, dont les uns sont perpendiculaires à la direction souhaitée

10 de migration des macromolécules, et dont les autres sont perpendiculaires aux premiers et à la direction de transfert des macromolécules sur les membranes.

Les électrodes 20 situées dans un même plan perpendiculaire à la direction souhaitée de migration, sont

15 reliées entre elles de façon à se trouver au même potentiel, tandis que les électrodes situées dans des plans différents de ce type doivent être à des potentiels différents, pour l'établissement d'un champ électrique parallèle à la direction souhaitée de migration. Par ailleurs, les

20 électrodes sont réunies entre elles, de la façon voulue, uniquement à leurs extrémités de façon à permettre la disposition, dans le réseau d'électrodes, d'une pile de plaques de gel 12 dont une grande face est pourvue d'une

25 membrane de transfert 22 et qui sont portées par des supports 24 d'un panier 26, représenté en traits fantômes uniquement en figure 2. Les plaques de gel 12 forment ainsi un empilement vertical, en étant maintenues espacées les

30 unes des autres et sont disposées de façon équidistante ou non, à volonté, entre des plans parallèles d'électrodes 20 en traversant chacune une série de plans perpendiculaires délimités par des électrodes 20.

Une électrode d'un plan vertical d'extrémité, par exemple l'électrode située au coin supérieur gauche du dessin de la figure 2, et l'électrode diagonalement oppo-

35 sée, sont reliées à deux bornes d'une source de tension électrique continue, les électrodes situées dans un même

13

plan vertical sont reliées entre elles pour être au même potentiel, et la série d'électrodes située dans un même plan vertical est reliée à la série d'électrodes située dans un autre plan vertical adjacent ou consécutif par une
5 résistance électrique 28 d'un pont diviseur de tension établissant entre elles de proche en proche une différence de potentiel prédéterminée.

Lorsqu'on souhaite obtenir un champ électrique uniforme à travers toutes les plaques 12, les résistances
10 28 ont toutes la même valeur et les plans verticaux d'électrodes sont équidistants.

Les plans verticaux parallèles délimités par les électrodes 20 sont des surfaces équipotentiellles, au moins au niveau des électrodes 20 qu'ils contiennent. Le
15 champ électrique E_1 ou gradient de potentiel développé entre les électrodes est normal aux surfaces équipotentiellles et est donc, de par la disposition géométrique des électrodes et des plaques de gel 12, parallèle en un très
20 grand nombre de points à la direction souhaitée de migrations des macromolécules, en ayant une amplitude sensiblement constante.

Il en résulte que les résultats de séparation des macromolécules par migration à travers les plaques de gel 12 sont, au moins en première approximation, fidèles et
25 répétitifs. Un étalonnage ou calibrage préalable du dispositif permettra, si nécessaire, de déterminer avec précision les éventuelles singularités du champ électrique qui seront de toute façon faibles, et d'en tenir compte pour une appréciation des résultats de séparation.

30 Corollairement, le procédé et le dispositif selon l'invention permettent de traiter simultanément un très grand nombre de plaques de gel 12.

La même disposition d'électrodes 20 est utilisée en figure 3 pour le transfert des macromolécules sur
35 les membranes 22 associées aux plaques 12. Seules changent, par rapport à la figure 2, les liaisons entre élec-

trodes, puisque l'on veut obtenir un champ électrique perpendiculaire aux plans des plaques 12.

Pour cela, les électrodes 20 contenues dans un même plan horizontal, parallèle aux plaques 12, sont reliées pour être au même potentiel, tandis que la série d'électrodes contenue dans un même plan horizontal est reliée à la série d'électrodes contenue dans un autre plan horizontal adjacent ou consécutif par une résistance 30 de valeur déterminée. Les plans horizontaux contenant les électrodes 20 définissent ainsi des surfaces équipotenti-
elles, auxquelles est perpendiculaire le champ électrique E_2 produit quand le plan horizontal supérieur d'électrodes 20 et le plan horizontal inférieur d'électrodes sont reliés à deux bornes opposées de la source de tension continue.

Lorsque toutes les résistances électriques 30 ont la même valeur, le champ électrique de transfert E_2 a la même amplitude pour toutes les plaques 12, quelle que soit leur disposition dans la pile.

Il est bien évident cependant qu'il suffit de modifier les valeurs des résistances 28 et 30 pour obtenir des distributions particulières de champ électrique à travers les plaques 12, dans la direction de migration et dans la direction de transfert des macromolécules. En contrôlant les valeurs des potentiels appliquées aux électrodes des plans d'extrémité, et la variation dans le temps de ces potentiels, on peut faire varier, localement ou dans l'ensemble du dispositif, l'amplitude du champ électrique, non seulement de façon permanente, mais également de façon cyclique. On peut ainsi, notamment, inverser la direction du champ électrique pendant une durée prédéterminée, puis l'inverser à nouveau pour le réorienter dans la direction souhaitée de migration ou de transfert.

On peut également réaliser un balayage, par commutation, d'une distribution donnée de potentiels appliqués à des plans successifs d'électrodes, cette distribution pouvant notamment comporter une inversion de champ

15

électrique, que l'on fera se déplacer de proche en proche dans le réseau d'électrodes

On peut encore balayer les plans successifs d'électrodes ou certains d'entre eux par une différence de potentiel déterminée, par exemple pour la migration des macromolécules dans les plaques de gel. Cela permet de faire agir le champ électrique de façon répétitive sur des fractions déterminées de la longueur des plaques de gel, ou sur toute leur longueur si on le souhaite, en créant ce champ au moyen d'une différence de potentiel plusieurs fois inférieure à la différence de potentiel qu'il faudrait appliquer, pour obtenir un champ électrique de même intensité, aux électrodes situées aux extrémités opposées des plaques de gel. Il en résulte des avantages importants, au niveau de la consommation d'énergie, du choix des composants de commutation des potentiels, de l'échauffement du liquide, de la formation des bulles dans ce liquide, etc...

La figure 4 représente schématiquement, en vue de bout, la disposition d'électrodes et leurs moyens de liaison qui permettent d'obtenir notamment les agencements des figures 2 et 3 pour la migration et le transfert, respectivement, des macromolécules.

En figure 4, chaque électrode 20 est disposée selon l'intersection d'un plan horizontal et d'un plan vertical (tous deux perpendiculaires au plan du dessin) et est reliée aux électrodes voisines par un composant électronique 32 à conduction commandée, telle qu'un transistor ou un thyristor, qui peut être sélectivement conducteur et bloqué, c'est-à-dire dont la résistance électrique est soit sensiblement nulle, soit sensiblement infinie.

Dans le mode de réalisation représenté, les composants 32 reliant les électrodes 20 situées dans des plans horizontaux différents sont tous reliés, par leur entrée de commande, à une même ligne 34 aboutissant à un circuit de commande 36. De même, tous les composants 32 reliant entre elles des électrodes 20 situées dans des plans

16

verticaux consécutifs, sont tous reliés, par leur entrée de commande, à une même ligne 38 aboutissant au circuit de commande 36. Ce circuit commande également les potentiels des électrodes 20 situées au coin supérieur gauche et au coin supérieur droit des dessins de la figure 4, par des lignes conductrices 40 et 42 respectivement.

Les électrodes contenues dans un même plan vertical sont reliées aux électrodes contenues dans le plan vertical adjacent par une résistance 28, et les électrodes contenues dans un plan horizontal sont reliées aux électrodes du plan horizontal adjacent par une résistance 30, ces résistances pouvant être de même valeur ou avoir des valeurs différentes, selon les cas de figure. On peut en particulier utiliser des résistances variables.

Lorsque tous les composants 32 reliant entre elles des électrodes situées dans des plans horizontaux successifs sont commandés pour avoir une résistance sensiblement nulle, et que tous les composants 32 reliant entre elles des électrodes situées dans des plans verticaux successifs sont commandés pour avoir une résistance sensiblement infinie, on obtient l'agencement de la figure 2.

Inversement, lorsque les composants 32 reliant entre eux des plans horizontaux successifs sont commandés pour avoir une résistance sensiblement infinie, et que les composants 32 reliant entre eux des plans verticaux successifs sont commandés pour avoir une résistance sensiblement nulle, on obtient l'agencement de la figure 3.

Lorsque les résistances 28 et 30 sont remplacées par des sources de potentiel variable, dont la valeur est commandée par un circuit de commande approprié tel qu'un amplificateur opérationnel, on obtient des champs électriques qui sont localement différents d'une zone d'une plaque à une autre.

Au moyen du circuit de commande 36, on peut également faire varier de la façon souhaitée les potentiels appliqués par les lignes 40 et 42 aux électrodes des coins

supérieur gauche et inférieur droit du réseau de la figure 4. On peut, de cette façon, inverser temporairement le champ électrique, à intervalles réguliers ou non, par exemple pour obtenir un champ électrique pulsé. On peut également balayer les plaques par une séquence de champs électriques qui sont localement différents, voire opposés.

Lorsque des séries de plaques de gel doivent être soumises à des champs électriques différents, c'est-à-dire dont les distributions dans l'espace et/ou les variations dans le temps sont différentes, on peut utiliser l'agencement représenté en figure 5 qui permet le traitement simultané d'un certain nombre de piles 46 de plaques de gel. Chaque pile 46 est associée à un système 48 d'électrodes du même type que celui de la figure 4, comprenant un circuit 36 de commande des variations du champ électrique à travers la pile de plaques. Chaque circuit de commande 36 est relié lui-même à un système central de commande 50 qui est par exemple piloté par un ordinateur. Dans ce cas, les variations de potentiel dans les systèmes d'électrodes 48 associés aux différentes piles de plaques 46 peuvent être à volonté identiques ou différentes, liées les unes aux autres ou indépendantes les unes des autres.

Le procédé et le dispositif selon l'invention permettent donc de réaliser des séparations de macromolécules de masses moléculaires différentes dans des conditions uniformes, ou encore d'étudier le comportement de macromolécules de même nature et de même masse moléculaire dans des champs électriques différents et dans des plaques de gel de nature différente.

Un avantage de l'agencement d'électrodes selon l'invention est que des plaques de gel peuvent occuper tous les emplacements prévus entre les plans d'électrodes, ou seulement certains d'entre eux, sans qu'il en résulte une modification de la distribution des champs électriques.

En pratique (figure 6), les électrodes 20 seront toutes fixées, par une extrémité, sur une même plaque

52 de matériau diélectrique incluant les composants 28, 30, 32 et les liaisons nécessaires. Comme les électrodes seront avantageusement des fils de matériau conducteur, elles seront fixées à leur autre extrémité sur une seconde
5 plaque de matériau diélectrique qui pourra comporter, ou non, certains des composants de liaison nécessaires.

La source de potentiel et les circuits de commande 36, 50 seront de préférence à l'extérieur du bain de liquide d'électrophorèse.

10 Comme on l'a représenté schématiquement en figure 2, les différentes plaques de gel sont montées sur des supports faisant partie d'un panier 26, déplaçable par translation à l'intérieur et à l'extérieur du réseau d'électrodes.

15 En variante (figure 7), les électrodes peuvent être limitées à des bandes conductrices 54 parallèles formées sur des parois 56 de la cuve, par exemple par métallisation.

20 Les cuves d'électrophorèse selon l'invention sont, de façon connue, équipées d'un système de circulation et de refroidissement du liquide d'électrolyse.

On se réfère maintenant aux figures 8 et 9 où l'on a représenté schématiquement un panier de support de plaques de gel selon l'invention.

25 Ce panier 60 comprend essentiellement des plaques horizontales 62 verticalement superposées et séparées les unes des autres d'une distance égale à la hauteur d'une plaque de gel disposée verticalement, certaines plaques 62 étant en retrait des parois de la cuve et/ou
30 perforées pour permettre le passage des bulles de gaz, ou même constituées par des grilles.

35 Les plaques 62, en matériau diélectrique, sont reliées entre elles par des électrodes verticales rectilignes 64 qui peuvent être des tiges rigides de matériau électroconducteur, ou encore de simples fils électroconducteurs tendus entre les plaques 62, dans ce cas reliées par

des montants rigides, non électriquement conducteurs, possédant la résistance mécanique voulue et disposés par exemple aux coins et au centre des plaques 62.

Les électrodes 64 sont disposées en un réseau à maille transversale rectangulaire ou carrée et ont essentiellement pour fonction d'être des lignes d'accrochage de surfaces équipotentielles.

Les plaques de gel 66 sont disposées verticalement sur les plaques 62, entre les électrodes 64, de telle sorte que la direction souhaitée de migration des macromolécules dans les plaques de gel soit horizontale.

Comme on le voit sur les figures 8 et 9, on peut disposer aux différents niveaux du panier 60 un assez grand nombre de plaques de gel 66, qui sont côte à côte et qui, à chaque niveau, forment par exemple deux séries de plaques, les plaques d'une série étant situées dans le prolongement des plaques correspondantes de l'autre série.

Comme on le souhaite, les plaques d'une série peuvent être orientées dans le même sens que les plaques de l'autre série, ou bien en sens contraire. Dans le premier cas, la différence de potentiel entre les extrémités du panier sera de l'ordre de deux fois la différence de potentiel à appliquer aux extrémités d'une plaque de gel. Dans le second cas, la différence de potentiel entre les extrémités du panier sera sensiblement égale à la différence de potentiel entre les extrémités d'une plaque de gel : on appliquera par exemple une tension V_1 aux électrodes 64₁ des extrémités du panier, et une tension V_2 aux électrodes 64₂ du plan médian transversal du panier, avec la différence $V_1 - V_2$ égale à la différence de potentiel à appliquer entre les extrémités d'une plaque de gel.

La figure 10 est une vue en perspective d'une variante de réalisation du panier, qui ne comprend qu'un seul niveau de chargement des plaques de gel, délimité entre deux plaques 62 de matériau diélectrique, dont seule la plaque supérieure est perforée pour permettre le passage

20

des bulles de gaz formées par électrolyse dans le liquide d'électrophorèse.

La figure 11 représente schématiquement une cuve destinée à recevoir le panier de la figure 10.

5 Cette cuve 70 est de forme parallélépipédique et comprend un fond 72 horizontal et quatre parois verticales 74, avec éventuellement une paroi horizontale supérieure mobile, non représentée sur le dessin.

10 Le fond 72 de la cuve comprend une série d'électrodes sensiblement ponctuelles 76 formant un réseau à maille carrée ou rectangulaire, identique à celui des électrodes 64 du panier, de telle sorte que, lorsque le panier sera placé dans la cuve, les électrodes ponctuelles 76 du fond 62 de la cuve se trouvent exactement dans le pro-
15 longement des électrodes verticales 64 du panier.

Comme représenté en figure 12, les extrémités inférieures des électrodes 64 peuvent comprendre des moyens de contact avec les électrodes ponctuelles 76 et de positionnement du panier dans la cuve.

20 Dans l'exemple représenté, chaque électrode filiforme 64 du panier est raccordée, à son extrémité inférieure, à un plot conducteur 78 ayant une surface inférieure semi-sphérique en saillie sur la face inférieure de la plaque de fond 62 du panier, et qui est reçue dans un
25 évidemment tronconique 80 d'un plot conducteur formant une électrode ponctuelle 76 du fond de la cuve.

Les électrodes ponctuelles 76 sont reliées entre elles, à l'extérieur de la cuve, par le circuit représenté en figure 13 et déjà décrit en référence à la figure 4, qui comprend des moyens de liaison commandés entre
30 électrodes 76 voisines. Les différentes rangées d'électrodes 76 sont reliées entre elles par des éléments de liaison 82 qui sont conducteurs avec une résistance électrique sensiblement nulle, ou bloqués avec une résis-
35 tance électrique sensiblement infinie. De même, les différentes colonnes d'électrodes ponctuelles 76 sont reliées

entre elles par des éléments de liaison 84, du même type que les éléments 82. En outre, des résistances 86, ou des éléments conducteurs équivalents, sont prévues entre les différentes rangées d'électrodes 76, et des résistances 88, ou des éléments conducteurs équivalents, sont prévues entre les différentes colonnes d'électrodes ponctuelles 76.

Les éléments de liaison 82 et 84 sont commandés de la façon suivante : quand les éléments de liaison 82 ont une résistance électrique sensiblement nulle, les éléments 84 ont une résistance électrique sensiblement infinie, de telle sorte que les colonnes d'électrodes ponctuelles 76 définissent des lignes équipotentiellles, et que deux colonnes successives d'électrodes ont entre elles une différence de potentiel déterminée par la valeur de la résistance 88 correspondante, les électrodes de l'angle supérieur gauche et de l'angle inférieur droit du circuit étant reliées à des sources de potentiel appropriées. Alternativement, lorsque les éléments de liaison 82 ont une résistance électrique sensiblement infinie, et les éléments 84 ont une résistance sensiblement nulle, les rangées d'électrodes ponctuelles définissent des lignes équipotentiellles et deux rangées successives ont entre elles une différence de potentiel déterminée par la valeur de la résistance 86 correspondante.

Les parois verticales 74 de la cuve 70 peuvent comprendre (figure 11) des électrodes linéaires verticales 90, formées par exemple par des lignes métallisées de leur surface interne, qui sont raccordées entre elles et aux rangées ou aux colonnes, respectivement, d'électrodes ponctuelles 76 du fond de la cuve par des éléments 82, 84.

On comprend le fonctionnement de la cuve 70 représentée en figure 11. Le panier chargé du nombre voulu de plaques de gel est placé dans la cuve et y est positionné automatiquement, grâce aux moyens de la figure 12, qui assurent en même temps la liaison électrique entre les électrodes ponctuelles 76 et les électrodes 64 du panier.

Par commande des éléments de liaison 82 et 84, on assure tout d'abord la migration des macromolécules dans les plaques de gel, parallèlement à la longueur de ces plaques, puis, en inversant les rôles des éléments de liaison 82 et 84, la migration des macromolécules à travers l'épaisseur des plaques de gel et leur transfert sur les membranes associées. Les rangées, puis respectivement les colonnes d'électrodes ponctuelles 76, ainsi que les électrodes linéaires 90 des faces verticales de la cuve, définissent des surfaces équipotentiellles planes permettant, comme déjà expliqué, des mesures fiables et rigoureuses.

En figure 11, la flèche en trait plein indique la direction dans laquelle les plaques de gel sont orientées, et les flèches en pointillés indiquent les directions du champ électrique, pour la migration et le transfert respectivement des macromolécules.

Le déplacement du panier dans la cuve 70 s'effectue par translation verticale, à travers la face supérieure ouverte de la cuve 70, par exemple au moyen d'un bras robot qui permet d'amener le panier dans une station de chargement-déchargement où l'on peut préparer un panier, pendant qu'un autre panier est en cours de traitement dans la cuve 70.

Dans une variante de réalisation plus simple représentée en figure 13, le fond 92 de la cuve comprend des électrodes ponctuelles 94, disposées selon un réseau carré à maille carrée et formant des rangées dans lesquelles elles sont raccordées entre elles par des conducteurs noyés dans le fond de la cuve. Ces rangées correspondent respectivement aux rangées d'électrodes 64 d'un panier et sont raccordées à leurs extrémités à des électrodes verticales 96 formées sur deux faces verticales opposées 98 de la cuve. Ces électrodes 94 et 96 définissent, avec les électrodes rectilignes 64 d'un panier, des plans équipotentiels qui sont perpendiculaires à la direction souhaitée de migration des macromolécules.

23

On procède donc de la façon suivante : le panier est placé dans la cuve de telle sorte que les plaques de gel qu'il contient s'étendent perpendiculairement aux plans équipotentiels définis par les électrodes linéaires 94 et 96. L'électrophorèse permet alors d'assurer la migration des macromolécules dans les plaques de gel, parallèlement à la longueur des plaques. On peut ensuite sortir le panier de la cuve, le faire tourner de 90° autour d'un axe vertical, puis de le replacer dans la cuve, de telle sorte que les plaques de gel seront parallèles aux plans équipotentiels définis par les électrodes linéaires 94 et 96. L'électrophorèse provoquera alors la migration des macromolécules dans l'épaisseur des plaques de gel, et leur transfert sur les membranes associées.

Les deux flèches en pointillé indiquent les orientations longitudinales des plaques de gel, dans les deux positions respectives de migration et de transfert des macromolécules, et les flèches en traits pleins correspondent à l'orientation du champ électrique entre les plans d'électrodes.

En variante, on peut prévoir deux cuves telles que celles de la figure 13, montées au voisinage immédiat l'une de l'autre, et réaliser dans l'une la migration des macromolécules sur la longueur des plaques de gel, et dans l'autre, le transfert des macromolécules sur les membranes associées.

Les deux autres faces verticales 100 de la cuve de la figure 13 sont dépourvues d'électrodes.

On peut utiliser, pour fixer les potentiels des différents plans d'électrodes, des amplificateurs opérationnels, commandés par un système de traitement de l'information. Il est alors très simple d'obtenir entre les plans d'électrodes des champs électriques variables dans le temps et dans l'espace, selon des lois cycliques ou non, d'utiliser des champs électriques de type impulsionnel, etc...

24

Par exemple, comme représenté sur la partie droite de la figure 12, des amplificateurs opérationnels 102 sont reliés chacun, à leur sortie, à une rangée d'électrodes 76. Une de leurs entrées est reliée à une sortie d'un circuit de commande 104, tandis que leur autre entrée est à la masse.

Lorsque les électrodes 76 forment un réseau carré, un commutateur multiple 106 permet d'appliquer les tensions de sortie des amplificateurs 102 soit aux rangées, soit aux colonnes d'électrodes 76.

En figure 14, on a représenté schématiquement des tubes ou manchons cylindriques 108 entourant les électrodes verticales 64 d'un panier. Ces tubes 108, ouverts à leurs extrémités, sont en matière diélectrique et sont soit perforés soit poreux, pour permettre le passage du liquide d'électrophorèse à travers leur paroi en direction des électrodes 64. Ces tubes forment ainsi des pièges à bulles, dans lesquels les bulles de gaz produites par électrolyse sont guidées vers la surface libre du liquide, sans venir au contact des plaques de gel. Ils servent aussi de protection des électrodes 64, et empêchent les plaques de gel 66 de venir au contact des électrodes. De plus, on peut alors utiliser des électrodes formées en un métal conducteur moins coûteux que le platine. Si d'éventuels dépôts sont formés par électrolyse au contact des ces électrodes, les tubes 108 évitent que ces dépôts puissent passer dans le bain de liquide dans lequel se trouvent les plaques de gel.

Dans ce qui précède, on a décrit des formes de réalisation de l'invention applicables au cas où, les plaques de gel étant verticales, les deux directions de migration et de transfert des macromolécules sont horizontales. Bien entendu, l'invention couvre aussi le cas où, les plaques de gel étant verticales, la direction de migration des macromolécules dans les plaques est verticale, et leur direction de transfert sur les membranes associées est horizontale. Il suffit pour cela d'utiliser des paniers

25

dans lesquels les électrodes 64 sont horizontales.

26

REVENDICATIONS

1) Procédé d'électrophorèse multiple pour assurer la migration contrôlée de macromolécules dans des plaques rectangulaires de gel, caractérisé en ce qu'il

5 consiste :

- à empiler plusieurs plaques de gel (12) perpendiculairement à leur plan en les maintenant espacées pour en former au moins une pile parallélépipédique,

- à disposer entre les plaques (12) et/ou au

10 voisinage des faces de cette pile une pluralité d'électrodes (20) allongées, par exemple filiformes, parallèles entre elles et aux plans des plaques, et contenues dans une série de plans perpendiculaires à une direction commune souhaitée de migration des macromolécules dans les

15 plaques,

- à immerger l'ensemble des plaques (12) et des électrodes (20) dans un bain de liquide approprié d'électrophorèse,

- à porter à un même potentiel les électrodes

20 (20) contenues dans un même plan perpendiculaire à la direction de migration,

- et à contrôler, dans l'espace et/ou dans le temps, les différences de potentiel entre les différents plans, pour créer dans le bain et à travers les plaques

25 (12) un champ électrique dont la direction est en tous points sensiblement parallèle à la direction souhaitée de migration.

2) Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que les électrodes (20) sont disposées aux intersections des plans précités avec une autre série de

30 plans perpendiculaires à une seconde direction souhaitée de migration, cette seconde direction étant perpendiculaire à la première, et en ce qu'il consiste à contrôler successivement les potentiels des plans de la première série, puis

35 les potentiels des plans de l'autre série, pour faire migrer les macromolécules dans lesdites plaques (12) succes-

27

sivement dans la première direction, puis dans la seconde direction citée.

3) Procédé selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce qu'il consiste à créer, par une distribution uniforme de potentiels sur les plans d'électrodes régulièrement répartis par rapport à la pile de plaques, un champ électrique uniforme à travers les plaques de la pile.

4) Procédé selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce qu'il consiste à faire varier l'amplitude et/ou le sens du champ électrique à travers les plaques (12) de la pile, par variation de la distribution des potentiels sur les plans d'électrodes.

5) Procédé selon la revendication 3 ou 4, caractérisé en ce que les variations dans le temps des différences de potentiel entre les plans d'électrodes sont synchrones et égales entre elles, pour faire varier dans le temps l'amplitude du champ électrique sans modifier sa distribution dans l'espace.

6) Procédé selon la revendication 4, caractérisé en ce qu'il consiste à faire varier localement les différences de potentiel entre plans d'électrodes, pour faire varier localement l'intensité du champ électrique.

7) Procédé selon la revendication 4, caractérisé en ce qu'il consiste à modifier temporairement ou cycliquement les différences de potentiel entre plans d'électrodes, par exemple pour réaliser un balayage des plans d'électrodes par une différence de potentiel.

8) Procédé selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il consiste à disposer côte à côte au moins deux piles (46) de plaques en les juxtaposant dans une direction parallèle ou perpendiculaire à la direction souhaitée de migration.

9) Procédé selon la revendication 8, caractérisé en ce qu'il consiste à faire varier de façon différente les champs électriques à travers les plaques des différentes piles (46).

28

10) Dispositif d'électrophorèse multiple pour assurer la migration contrôlée de macromolécules dans des plaques de gel, comprenant une cuve destinée à recevoir les plaques de gel, des électrodes agencées pour créer un champ électrique dans les plaques de gel et des moyens d'amenée dans la cuve et d'extraction de la cuve d'un liquide approprié d'électrophorèse, caractérisé en ce qu'il comprend :

- des moyens de support (24-26) destinés à recevoir au moins un empilement de plaques de gel (12) en les maintenant espacées les unes des autres,

- une série d'électrodes (20) parallèles entre elles et aux plaques de la pile, disposées dans des plans perpendiculaires à une direction souhaitée de migration des macromolécules à travers les plaques,

- des moyens (32) de liaison électrique entre électrodes (20) d'un même plan, permettant en particulier de les maintenir par un même potentiel,

- des moyens (28,30) de liaison entre électrodes de plans différents, permettant en particulier de maintenir une différence de potentiel entre deux plans consécutifs,

- des moyens (36) d'application de potentiel au moins aux électrodes situées dans des plans d'extrémité entre lesquels est disposée la pile de plaques,

- et des moyens de commande pour faire varier dans l'espace et/ou dans le temps la distribution des potentiels des électrodes desdits plans.

11) Dispositif selon la revendication 10, caractérisé en ce que les électrodes (20) sont disposées aux intersections de deux séries de plans, les premiers étant perpendiculaires aux plaques (12) et à la direction souhaitée de migration, les seconds étant perpendiculaires aux premiers et parallèles aux plaques (12).

12) Dispositif selon la revendication 11, caractérisé en ce qu'il comprend des moyens (32) de liaison électrique entre électrodes contenues dans un même second

plan pour les porter à un même potentiel, et des moyens (30) de liaison entre électrodes de seconds plans différents pour établir une différence de potentiel entre des seconds plans successifs et créer un champ électrique E_2 perpendiculaire aux plaques, et définissant une seconde direction de déplacement des macromolécules.

13) Dispositif selon l'une des revendications 10 à 12, caractérisé en ce que les électrodes (20) sont réparties régulièrement le long des plaques de gel, ainsi qu'entre les plaques.

14) Dispositif selon l'une des revendications 10 à 13, caractérisé en ce que les moyens (30) de liaison entre deux électrodes consécutives d'un même plan sont du type à conduction électrique commandée, variable entre un état de conduction à résistance sensiblement nulle et au moins un état de conduction à résistance de valeur prédéterminée non nulle.

15) Dispositif selon la revendication 14, caractérisé en ce que les moyens (30) de liaison précités sont commandés par des moyens (36) communs à toutes les électrodes situées dans un même groupe de plans parallèles.

16) Dispositif selon l'une des revendications 10 à 15, caractérisé en ce que les moyens (28,30,32) de liaison entre électrodes et les moyens de commande (36) sont portés par au moins une plaque de matière diélectrique, sur laquelle sont fixées les électrodes (20) par une de leurs extrémités.

17) Dispositif selon l'une des revendications 10 à 16, caractérisé en ce que chaque plaque de gel (12) se trouve, dans la cuve d'électrophorèse, entre deux groupes d'électrodes coplanaires.

18) Dispositif selon l'une des revendications 10 à 17, caractérisé en ce que le support est destiné à recevoir au moins deux piles (46) de plaques disposées côte à côte et juxtaposées dans au moins une direction parallèle à leurs plans, et en ce qu'une série d'électrodes (48) du

30

type précité, comprenant les moyens précités de commande et de liaison entre électrodes, est associée à chaque pile de plaques (46) pour créer dans les plaques des différentes piles des champs électriques qui sont à volonté identiques ou différents, liés ou indépendants les uns des autres.

19) Dispositif selon l'une des revendications 10 à 18, caractérisé en ce que les moyens de commande précités sont automatisés, par exemple pilotés par ordinateur.

20) Dispositif selon l'une des revendications 10 à 19, caractérisé en ce que les plaques de gel (66) sont disposées verticalement dans la cuve (70) entre lesdites électrodes (64).

21) Dispositif selon la revendication 20, caractérisé en ce que les électrodes (64) sont des barreaux d'un panier mobile (60) formant le support des plaques de gel (66).

22) Dispositif selon la revendication 21, caractérisé en ce que les extrémités, par exemple inférieures, des électrodes (64) comportent des moyens (78) de liaison ou de raccordement à des électrodes (76, 94) portées par la paroi correspondante (72, 92), par exemple de fond, de la cuve.

23) Dispositif selon la revendication 22, caractérisé en ce que les moyens (70) de liaison ou de raccordement forment également des moyens de positionnement du panier (60) dans la cuve.

24) Dispositif selon la revendication 22 ou 23, caractérisé en ce que les électrodes (76) de la paroi précitée (72) de la cuve sont des électrodes sensiblement ponctuelles.

25) Dispositif selon la revendication 22 ou 23, caractérisé en ce que les électrodes (94) de la paroi précitée (92) de la cuve sont sensiblement ponctuelles et reliées entre elles par des conducteurs parallèles, perpendiculaires à la direction souhaitée de migration des macromolécules dans les plaques de gel.

31

26) Dispositif selon l'une des revendications 22 à 25, caractérisé en ce que les parois verticales (74, 98, 100) de la cuve comportent des électrodes linéaires (90, 96) perpendiculaires à la direction souhaitée de migration des macromolécules et raccordées à des moyens de liaison commandés permettant sélectivement d'établir entre elles des différences de potentiel ou de les mettre à un même potentiel.

27) Dispositif selon l'une des revendications 21 à 26, caractérisé en ce que ledit panier (60) contient au moins, à un même niveau, deux séries de plaques de gel (66) dans lesquelles les plaques d'une série sont sensiblement dans le prolongement des plaques de l'autre série, et orientées soit dans le même sens, soit dans le sens contraire.

28) Dispositif selon l'une des revendications 10 à 27, caractérisé en ce que les électrodes (64) sont entourées par des manchons ou tubes cylindriques (108) en matière diélectrique, perforés ou poreux, formant des pièges à bulles.

FIG.1

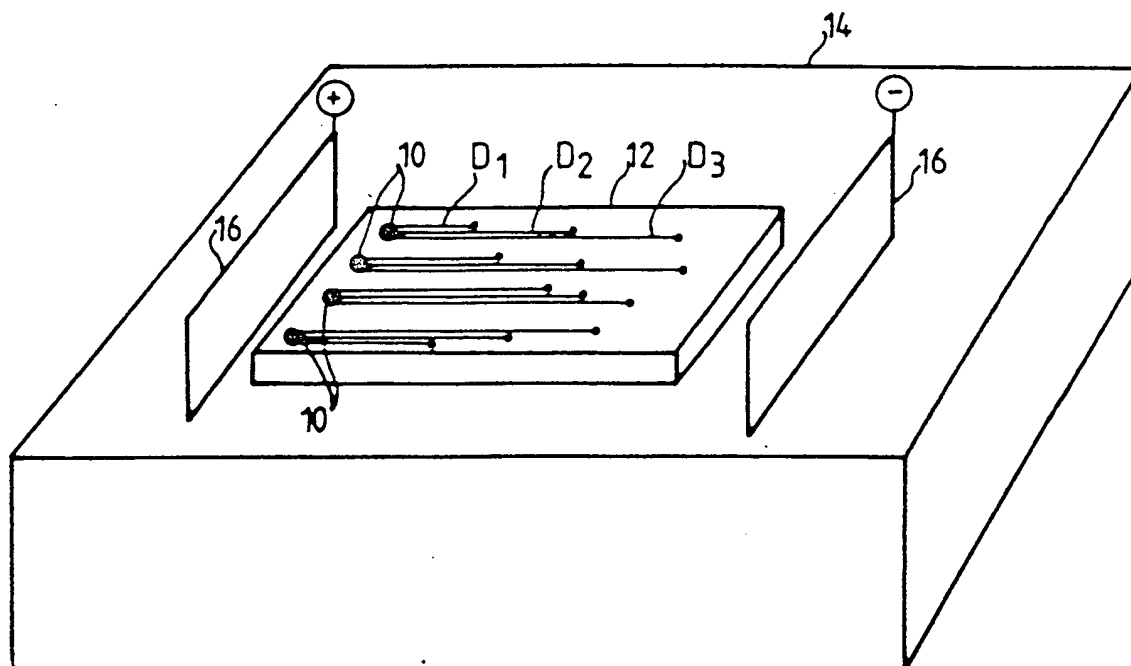


FIG. 2

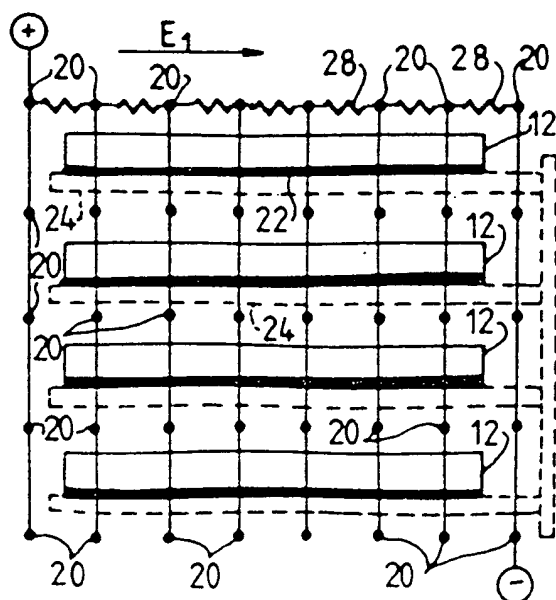
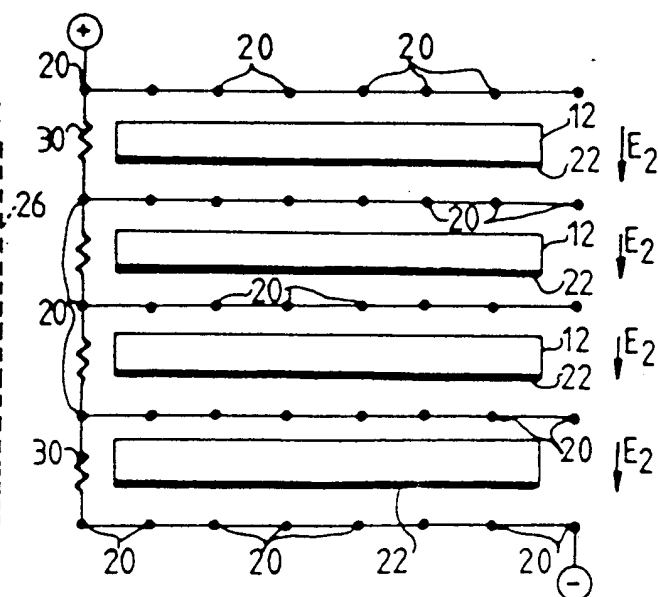
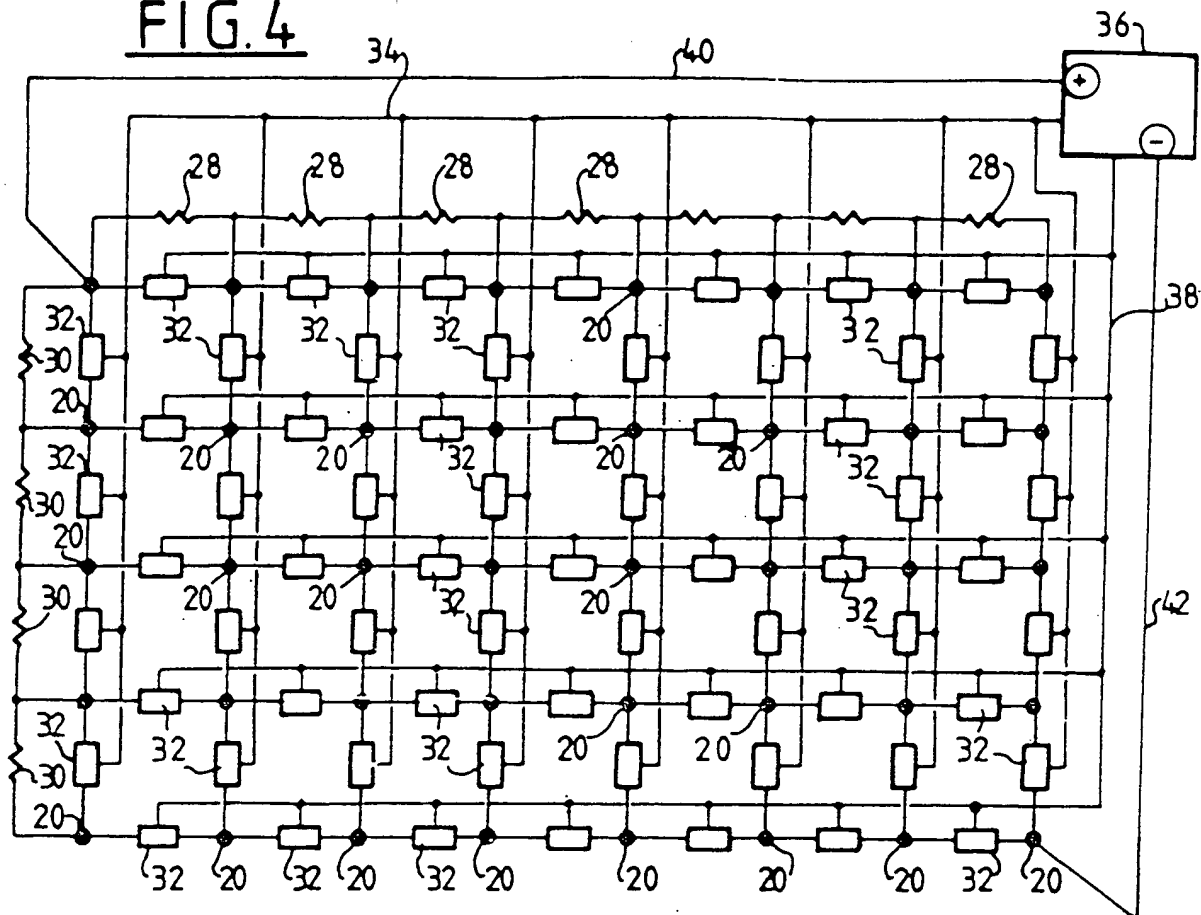
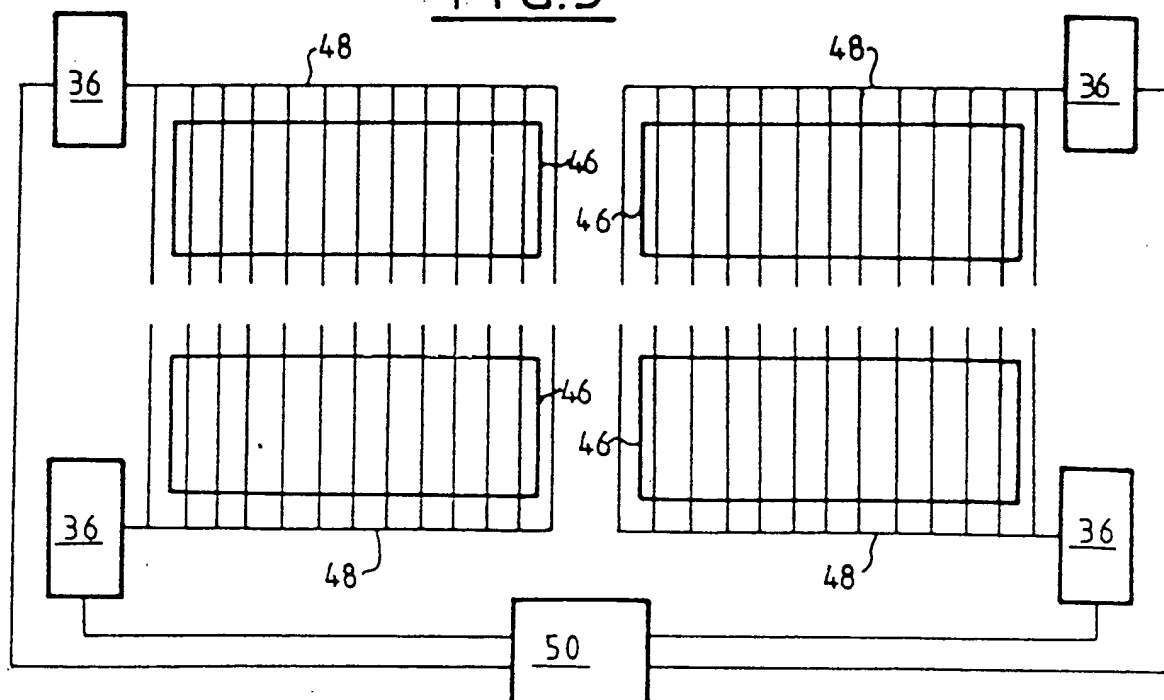


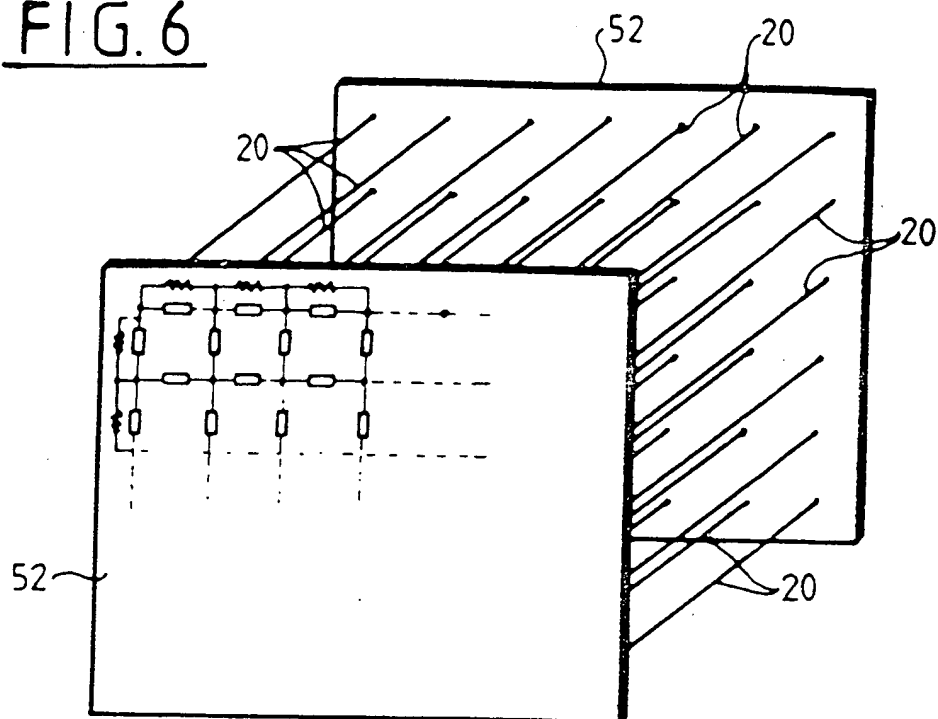
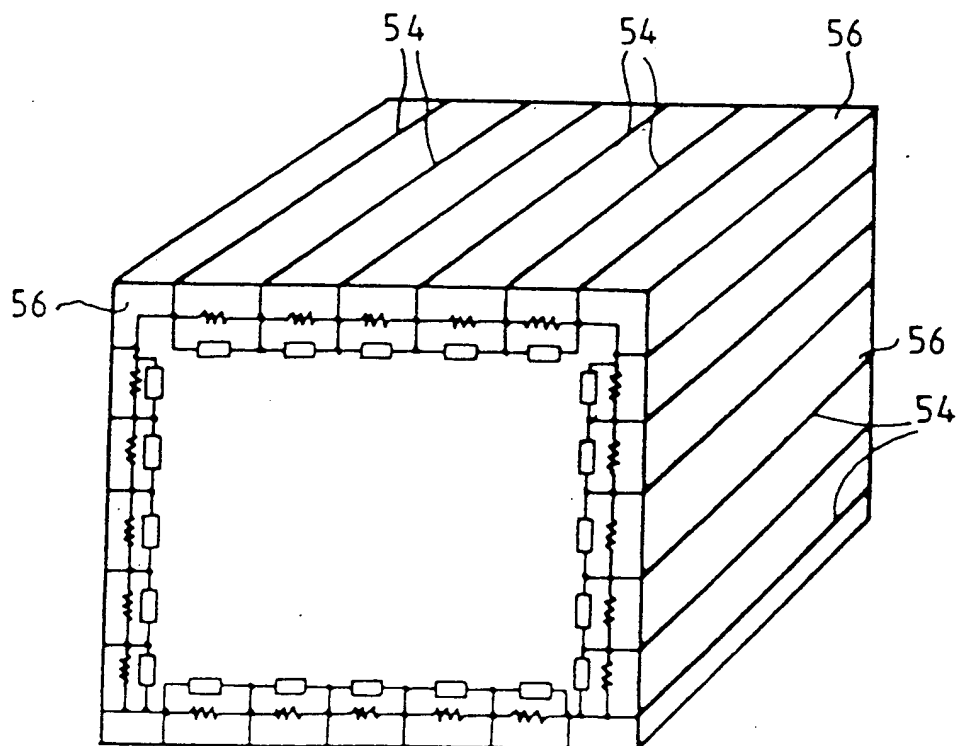
FIG.3



2/6

FIG. 4FIG. 5

3/6

FIG. 6FIG. 7

4/6

FIG.8

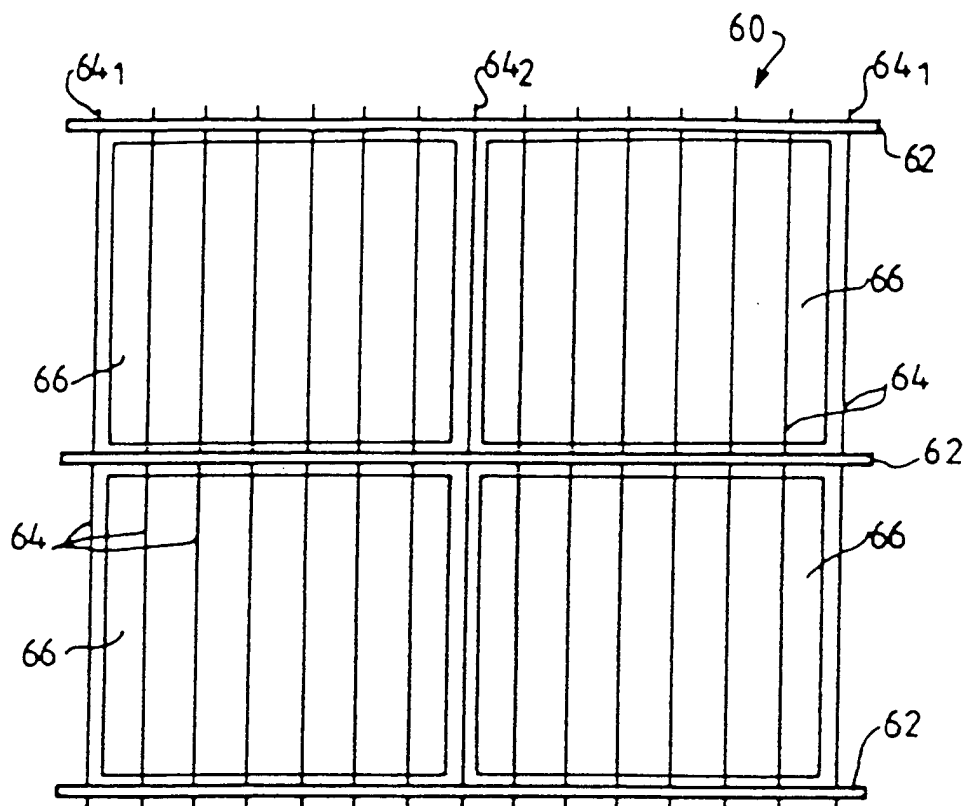


FIG.9

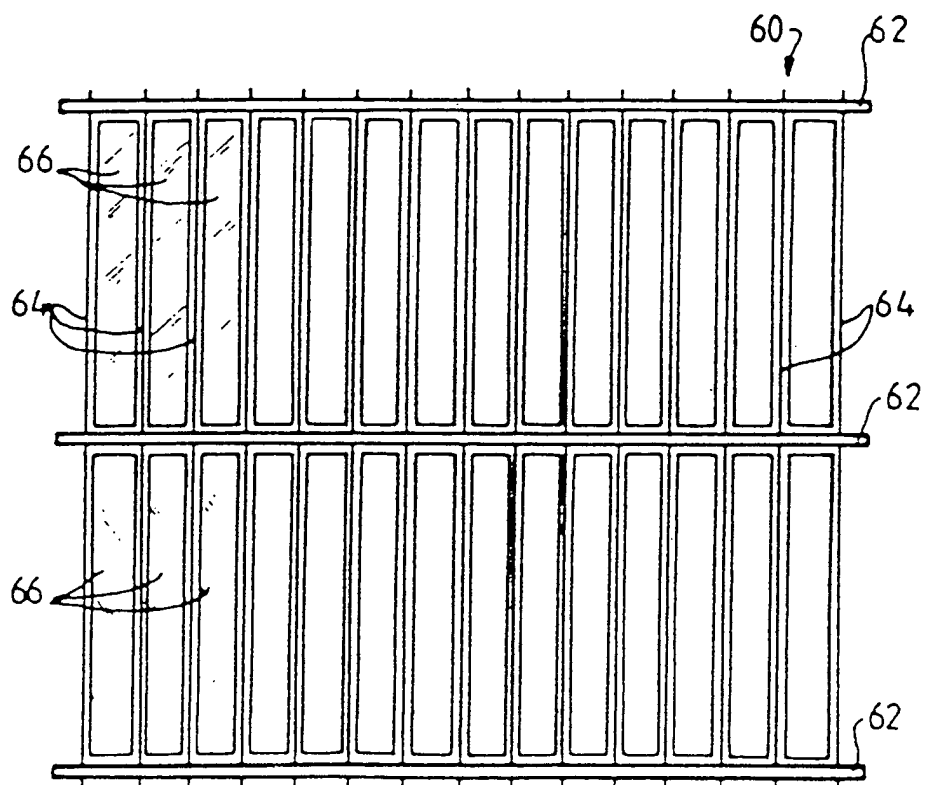


FIG. 10

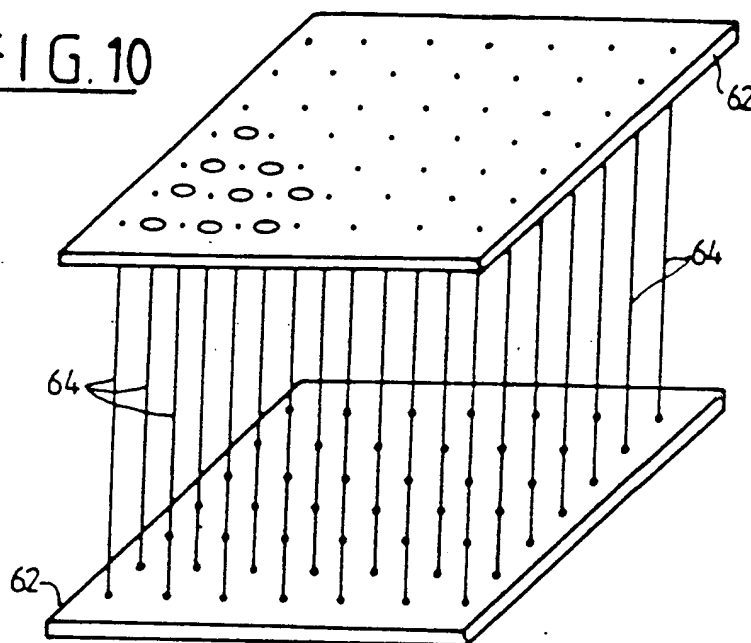


FIG. 11

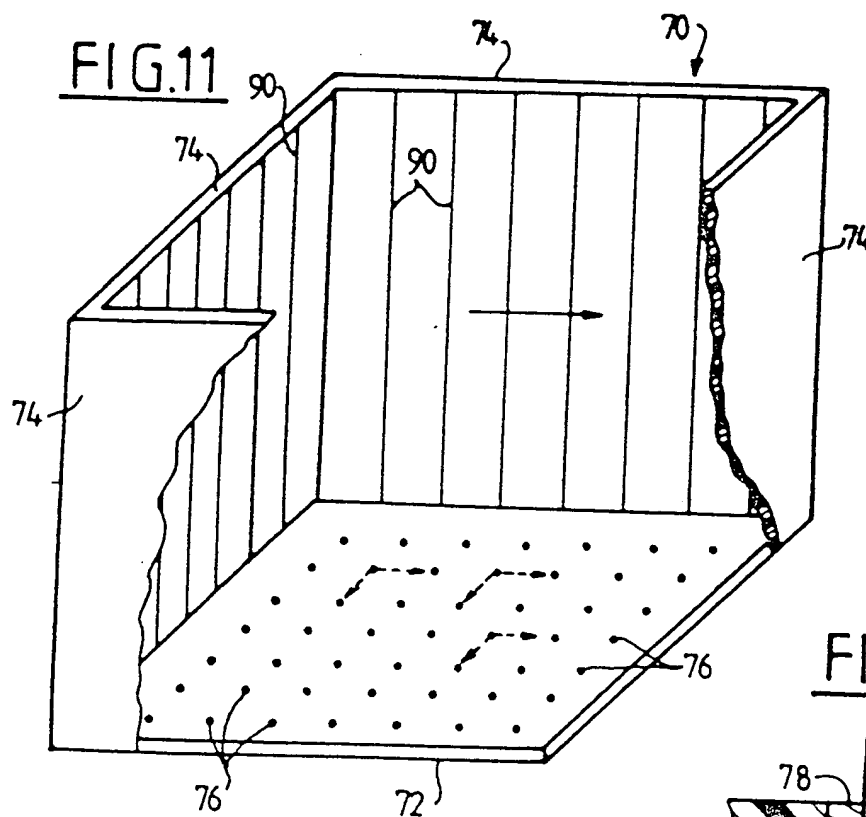
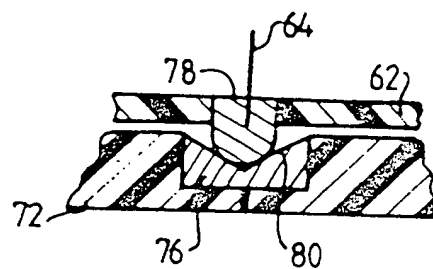


FIG. 12



FEUILLE DE REMPLACEMENT

FIG. 13

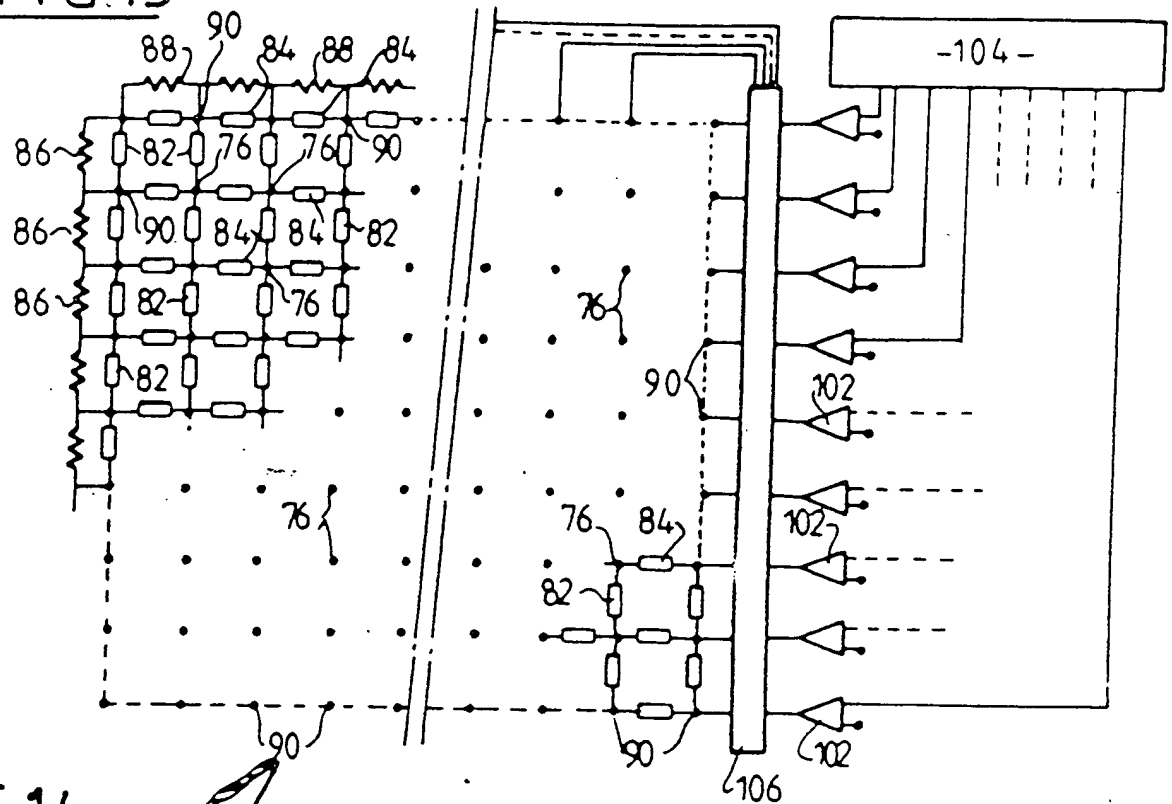


FIG. 14

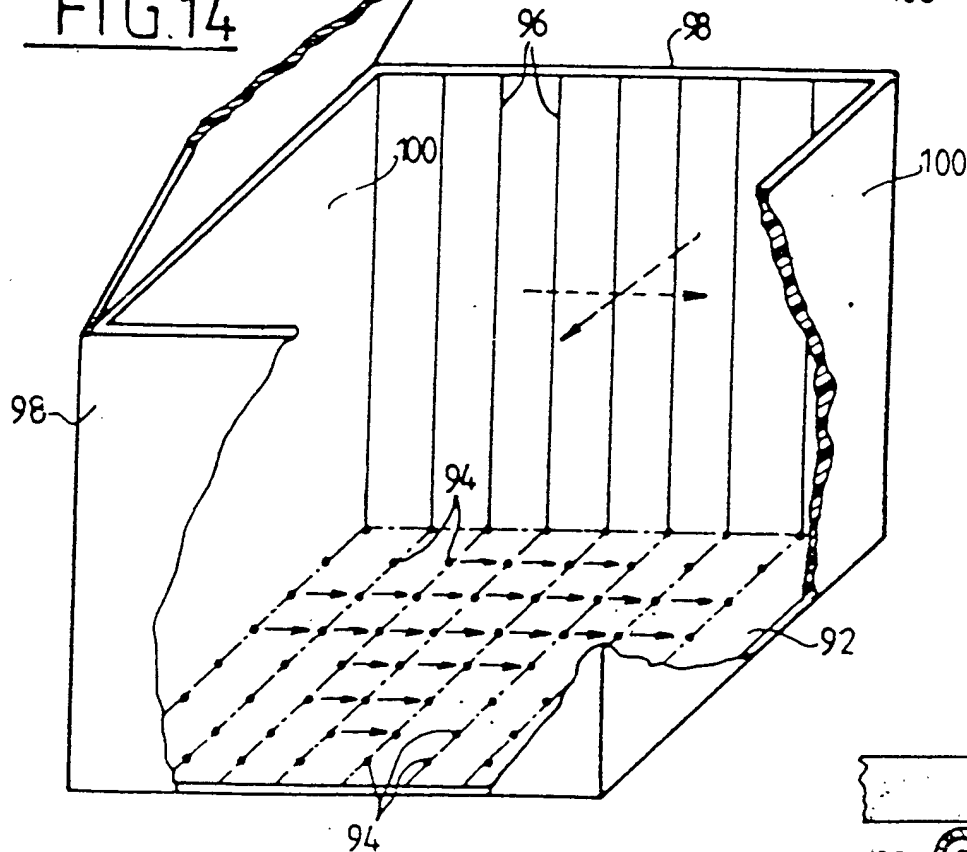
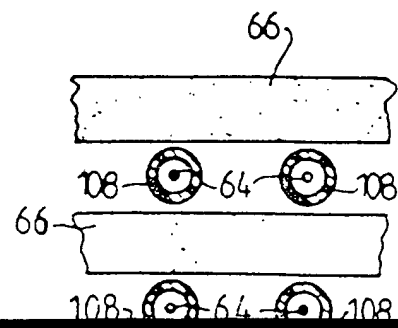


FIG. 15



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/FR 89/00441

| | | |
|--|--|-------------------------------------|
| I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (if several classification symbols apply, indicate all) * | | |
| According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC | | |
| Int.Cl. ⁵ : B 01 D 57/02, C 07 K 3/14, G 01 N 27/26 | | |
| II. FIELDS SEARCHED | | |
| Minimum Documentation Searched ⁷ | | |
| Classification System | Classification Symbols | |
| Int.Cl. ⁵ : | B 01 D, C 07 K, G 01 N | |
| Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched ⁸ | | |
| | | |
| III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT ⁹ | | |
| Category * | Citation of Document, ¹¹ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹² | Relevant to Claim No. ¹³ |
| A | US, A, 4416761 (G. BROWN) 22 November 1983, see figures 1-3; claim 1 -.- | 1-28 |
| A | WO, A, 84/02001 (COLUMBIA UNIVERSITY) 24 May 1984, see figures 1-8 -.- | 1-28 |
| A | EP, A, 0256737 (LELAND STANFORD UNIVERSITY) 24 February 1988, see figures 1-5 -.- | 1-28 |
| A | DE, A, 2107092 (MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT) 31 August 1972, see figures 1-5 -.- | 1-28 |
| A | DE, A, 2204697 (ST. GUSSMANN) 9 August 1973, see figures 1-4 -.- | 1-28 |
| A | US, A, 3879280 (J. PETERSON) 22 April 1975, see figure 3 ----- | 1-28 |
| <p>* Special categories of cited documents: ¹⁰</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>"&" document member of the same patent family</p> | | |
| IV. CERTIFICATION | | |
| Date of the Actual Completion of the International Search | Date of Mailing of this International Search Report | |
| 3 November 1989 (03.11.89) | 12 December 1989 (12.12.89) | |
| International Searching Authority | Signature of Authorized Officer | |
| European Patent Office | | |

ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT
ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO.

FR 8900441

SA 31194

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The members are as contained in the European Patent Office EDP file on 28/11/89
The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|---|---------------------|----------------------------|---------------------|
| US-A- 4416761 | 22-11-83 | None | |
| WO-A- 8402001 | 24-05-84 | US-A- 4473452 | 25-09-84 |
| | | AU-B- 565758 | 24-09-87 |
| | | AU-A- 2333484 | 04-06-84 |
| | | CA-A- 1207275 | 08-07-86 |
| | | EP-A,B 0125310 | 21-11-84 |
| | | US-A- 4695548 | 22-09-87 |
| EP-A- 0256737 | 24-02-88 | JP-A- 63113351 | 18-05-88 |
| DE-A- 2107092 | 31-08-72 | None | |
| DE-A- 2204697 | 09-08-73 | None | |
| US-A- 3879280 | 22-04-75 | None | |

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale N°

PCT/FR 89/00441

| | | |
|--|---|--|
| I. CLASSEMENT DE L'INVENTION (si plusieurs symboles de classification sont applicables, les indiquer tous) ⁷ | | |
| Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB | | |
| CIB ⁵ : B 01 D 57/02, C 07 K 3/14, G 01 N 27/26 | | |
| II. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTÉ | | |
| Documentation minimale consultée ⁸ | | |
| Système de classification | Symboles de classification | |
| CIE ⁵ | B 01 D, C 07 K, G 01 N | |
| Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où de tels documents font partie des domaines sur lesquels la recherche a porté ⁹ | | |
| | | |
| III. DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS ¹⁰ | | |
| Catégorie [*] | Identification des documents cités, ¹¹ avec indication, si nécessaire, des passages pertinents ¹² | N° des revendications visées ¹³ |
| A | US, A, 4416761 (G. BROWN) 22 novembre 1983, voir figures 1-3; revendication 1 -- | 1-28 |
| A | WO, A, 84/02001 (COLUMBIA UNIVERSITY) 24 mai 1984, voir figures 1-8 -- | 1-28 |
| A | EP, A, 0256737 (LELAND STANFORD UNIVERSITY) 24 février 1988, voir figures 1-5 -- | 1-28 |
| A | DE, A, 2107092 (MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT) 31 août 1972, voir figures 1-5 -- | 1-28 |
| A | DE, A, 2204697 (ST. GUSSMANN) 9 août 1973, voir figures 1-4 -- | 1-28 |
| A | US, A, 3879280 (J. PETERSON) 22 avril 1975, voir figure 3 ----- | 1-28 |
| <p>[*] Catégories spéciales de documents cités: ¹¹</p> <p>« A » document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>« E » document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>« L » document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)</p> <p>« O » document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>« P » document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p> <p>« T » document ultérieur publié postérieurement à la date de dépôt international ou à la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention</p> <p>« X » document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive</p> <p>« Y » document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier.</p> <p>« & » document qui fait partie de la même famille de brevets</p> | | |
| IV. CERTIFICATION | | |
| Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée | Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale | |
| 3 novembre 1989 | 12. 12. 89 | |
| Administration chargée de la recherche internationale | Signature du fonctionnaire autorisé | |
| OFFICE EUROPEEN DES BREVETS | T.K. WILLIS | |

ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE
RELATIF A LA DEMANDE INTERNATIONALE NO.

FR 8900441

SA 31194

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche internationale visé ci-dessus.

Lesdits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du 28/11/89

Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets.

| Document brevet cité au rapport de recherche | Date de publication | Membre(s) de la famille de brevet(s) | Date de publication |
|---|------------------------|---|------------------------|
| US-A- 4416761 | 22-11-83 | Aucun | |
| WO-A- 8402001 | 24-05-84 | US-A- 4473452 | 25-09-84 |
| | | AU-B- 565758 | 24-09-87 |
| | | AU-A- 2333484 | 04-06-84 |
| | | CA-A- 1207275 | 08-07-86 |
| | | EP-A,B 0125310 | 21-11-84 |
| | | US-A- 4695548 | 22-09-87 |
| EP-A- 0256737 | 24-02-88 | JP-A- 63113351 | 18-05-88 |
| DE-A- 2107092 | 31-08-72 | Aucun | |
| DE-A- 2204697 | 09-08-73 | Aucun | |
| US-A- 3879280 | 22-04-75 | Aucun | |